根瘤菌與豆科宿主的關係

宋樹群[1]　林良平[2]

[1] 私立長庚醫學院分子細胞科

[2] 國立台灣大學農業化學系

摘　　要

根瘤菌與豆科宿主形成具固氮能力之根瘤，有關此一反應於1888年確立至今已逾百年，根瘤菌感染豆科宿主的過程已具大致的形式，但其細部的反應仍爲假說的階段。有關二者間的關係早期係經由交互接種的方式確定菌種的分類地位，進而予以命名，也於此結果得知專一感染的現象。1974年確定學名者計有六種，此後關於根瘤菌命名方法重新修改目前關係較接近者計有三屬。對於專一感染的機轉曾有“凝集素--多醣體辨任假說”解釋此一現象，此一假說中認爲豆科宿主的根毛表面分泌的凝集素與菌體分泌之細胞外多醣體間具專一辨認的反應，藉此反應建立菌體與宿主間的橋樑，達到專一感染的目的，惟此反應無法獲得直接的證據且有許多相異之結果被發表，因此該假說無法支持說明專一感染的現象。近年發現根瘤菌會受到植物根分泌物中屬於黃素的化合物誘導，使菌體分泌出一些寡醣，目前咸信類黃素及寡醣爲訊號化合物，藉這些化合物間的差異誘使結瘤基因開啓，使能進行感染的反應，所以，現今根瘤菌與宿主間關係的研究，除了以交互感染確立最佳感染結果外，並需經由更多的反應及不同的技術，如免疫化學、基因工程及其他方法，方能更進一步推測二者間可能的專一關係。

關鍵字：*Rhizobium*、豆科植物、凝集素、多醣體、類黃素、nod 基因

前　　言

豆科植物爲植物中相當重要的一種植物，其範圍包含草本及木本植物，可再分爲Mimosoidae、Casealpinoideae 及Papilionoideae 等三個亞科。一般作爲作物的豆科植物多爲草本性，可提供爲牧草及雜糧等經濟效益，並且可被混合至土壤中當作綠肥，供給其他作物所需的養份，減少化學肥料的需求；同時增加土壤有機質的含量，有助於改良土壤物理化學的性質，爲一具多功能性的生物性肥料。

土壤中氮的循環，除來自動物糞便，動、植物及微生物殘體之分解，及其他許多來源外，其中相當重要的一種爲微生物固氮作用，此一作用係微生物之固氮酵素將空氣中游離的氮氣 (N_2) 轉變成植物可直接利用的氮素 (NH_4^+)。此一反應可分爲游離性 (free-living) 固氮作用，及共生性(Symbiotic)固氮作用。兩者間的差異據估計游離性固氮作用約1Kg N ha^{-1} $year^{-1}$左右，但共生性固氮作用可達300Kg N ha^{-1} year-1以上[1]。由此可知共生性固氮作用之重要性。因其可直接提供植物所需NH_4^+-N，亦爲優良的生物肥料。

植物與微生物間的共生現象，主與係探討互利共生的表現，即植物提供微生物行固氮作用所需的碳源，而微生物固氮後提供植物氮素。此一共生固氮現象，目前觀察的結果均在根瘤中

進行。豆科植物目前已知的約 7,540 屬，16,000 至19,000 種植物中，只有 15% 被測定可形成根瘤，主要的屬Mimosoidae及Papilionoideae兩種亞科的植物(2-4)。

根瘤菌感染豆科宿主結瘤的反應，經實驗觀察的結果顯示，二者間存專一感染的表現，因此本文就根瘤菌分類、凝集素與多醣體反應及 nod 基因等項分別討論之。

根瘤菌的分類

根瘤菌自1888年被Beijerinck分離，於1889年被命名爲*Rhizobium*，至今已有百餘年之歷史。其分類早期係經由交互接種(cross-inoculation)的結果，另配合生理生化之反應而加以分類命名。所謂交互接種爲自某一豆科植物根瘤中所分離之根瘤菌，除再接種於原分離之植物外，同時與其他不同種的豆科植物接種，由產生根瘤與否確定該根瘤菌與宿主之感染關係。如自大豆(Soybean, *Glycine max.* L.)根瘤分離之根瘤菌除接種大豆外，另接種至*Vicia*、*Phaseolus*、*Medicago*及其他豆科植物，由此交互接種之結果發現根瘤菌與其共生宿主間存有專一感染的結果。但是有許多根瘤菌在接種時產生例外的現象，即除感染原分離之植物，尙可感染其他豆科植物，如感染Lupinous之根瘤菌尙可感冉其他的豆科植物。因此有學者指出此一交互接種不應作爲分類之參考因子，唯至目前爲止，大多數的學者仍認爲此一現象仍具有重要影響之參考因素。

根瘤菌於1984年以前依據1974年第八版的Bergey's Manual of Determinative Bacteriology分成兩個族群、六個菌種，即快生性與慢生性兩族群，此一分類如表一所示(5-7)。在表中可發現主要係依據菌體之世代時間(generation time)及宿主予以分類。其中快生性是指菌體二至四小時分裂一次的菌種，慢生性係指六至八小時以上者。除了此者因素，在分類的參考因素尙包括醣類利用情形、鞭毛著生位置、血清反應、營養需求、代謝、DNA鹼基比及DNA雜交反應等資料，最後定出分類的名稱。

表一、1984年以前根瘤菌屬的分類(5-7)。
Table 1. Classification of rhizobia before 1984.

菌種	宿主
Group I	
Rhizobium leguminosarum	*Lathyrus, Pisum, Lens, Vicia*
Rhizobium phaseoli	*Phaseolus*
Rhizobium trifolii	*Trifolium*
Rhizobium meliloti	*Medicago, Meilotus, Trigonella*
Group II	
Rhizobium japonicum	*Glycine*
Rhizobium lupini	*Lupinus, Serradella, Ornithopus*

如上所述根瘤菌分成快生性及慢生性兩大族群，為利於區分，於1980 年第四次國際固氮研討會中，將慢生性固氮菌獨立成屬，命名為 *Bradyrhizobium*，Brady-係由希臘字Bradus轉變而來，意思是緩慢slow的意思[8]。

此後根瘤菌之分類也由於生物技術之進步，由於親源關係的研究結果而予以重新分類，其結果如表二所示[8-15]。在表二中可明顯發現於表一中快生性族群中之*R. leguminosarum*、*R. phaseoli*及*R. trifolii* 因親源關係非常接近，被合併為一個菌種，但因在感染宿主時的差異，而分成三個亞種。並且增加了*R. loti*及*R. fredii*，其中*R. fredii*是分離自大豆的根瘤中，因其不論在世代時間、生理、生化反應、DNA鹼基比反應及其他反應均與*Rhizobium japonicum*不同，且在親緣關係的分析中較接近*Rhizobium meliloti*，因此予以獨立另成新種，並且為紀念E. B. Fred對根瘤菌之貢獻，命名為*R. fredii*。而慢生性之根瘤菌，因對*R. lupini*之研究發現尚有許多未確定的資料待深入探討，故將其種名予以去除。因此於1984年第九版之Bergey's manual of Systematic Bacteriology中，根瘤菌屬之內容有了很大的改變[9]。此外，尚有其他新的菌種陸續被發現，均整理於表二中。在表中較特殊者為一新的根瘤菌屬*Azorhizobium*被確定，此一菌屬係感染結瘤於植物的根及莖，並可分別於根及莖的部份結瘤[15]，此一菌屬尚有許多功能未知，其可利用的研究尚待更進一步的發展。

凝集素—多醣體的辨識假說

由根瘤菌之分類可得知，根瘤菌與被感染宿主間存有專一感染的現象，此一性質不僅影響根瘤菌的利用效率，也影響其固氮活性。

根瘤菌與其宿主間如何進行專一辨識，至今仍無一較確定的學說予以說明之。在初期感染辨識，有 Dazzo 及 Hubbell 提出"凝集素—多醣體的辨識假說"。其不凝集素(lectin)來自拉丁字 legere，含有選擇的意思，能選擇特殊的醣類構造而與之結合[16,17]。凝集素分佈於動、植物及微生物體內，在植物大多主要存在於種子(尤其子葉中)，也有部份為分佈於全部植物體中。凝集素於1888年Stillmark自篦麻子中分離出並發現它能與動物紅血球產生凝集反應，此後又發現它能與具抗原性之多醣體及醣蛋白發生沉澱作用。由於凝集素可與特定的醣類鍵結形成複合物，所以在功能上可作為細胞辨識的介質[18]。

根瘤菌與豆科凝集素專一辨識的發展為1973 Hamblin與Keat發現*Phasealus vulgaris*的根瘤及根瘤以下之根表面分離的凝集素具凝集能力，認為此一凝集素可幫助菌體與根鍵結，此一鍵結位置利於細菌的感染[19]。之後Bohlool與Schmidt之結果顯示二十五株的大豆根瘤菌中有二十三株可與大豆凝集素鍵結，反之則大都不會有此現象，因此他們認為豆科凝集素與根瘤菌表面多醣體間的反應可說明宿主與根瘤菌間的專一感染現象[20]。而Dazzo與Hubbell觀察自苜蓿與*R. trifolii*的感染發現菌體胞外夾膜多醣體與凝集素的反應有助於菌體的感染，因此提出此一假說[21]。

表二、1984年以後根瘤菌分類表。
Table 2. Classification of rhizobia after 1984.

菌　　種	宿　主	參考文獻
Rhizobium		
R. leguminosarum biovar viciae	*Pisum*	Jordan, et al. 1984
R. leguminosarum biovar trifolii	*Trifolium*	Jordan, et al. 1984
R. leguminosarum biovar phaseoli	*Phaselous*	Jordan, et al. 1984
R. meliloti	*Medicago*	Jordan, et al. 1984
R. loti	*Lotus*	Jarvis, et al. 1982
R. fredii	*Glycine*	Scholla, et al. 1984
R. galegae	*Galega*	Lindstrom, et al. 1989
R. huakuii	*Astragalus*	Chen, et al. 1991
R. tropici	*Phaseolus*	Martinez - Romero, et al. 1991
R. etli	*Phaseolus*	Segovia, et al. 1993
Bradyrhizobium		
B. japonicum	*Glycine*	Jordan, et al. 1982
Azorhizobium		
A. caulinodans	Sesbania	Dreyfus, et al. 1988

在此一假說爲前提下許多的研究均顯示其結果支持此一假說，如Dazzo 等人的研究指出白苜蓿的凝集素 trifoliin A 與 *R. trifolii* 的莢膜多醣體專一鍵結外，trifoliin A 的接受者爲2-deoxyglucose[22,23]。Peau 等人探討 *R. meliloti*與紫苜蓿的凝集反應也支持根表面凝集素在辨識及與根瘤菌鍵結上扮演的角色[24]。在大豆的研究，由於研究者間的結果差異，有的顯示胞外多醣體及夾膜多醣體參考此一反應[25,26]，也有結果顯示是指多醣體作爲大豆凝集素的接受者[27,28]，但是均顯示豆科植物的凝集素與根瘤菌體的多醣體間的鍵結反應爲決定專一性感染的機制。

但是也有許多的研究結果不支持此一假說，如 Pueppke 之實驗中，十四株*B. japonicum*中有四株可與花生共生結瘤，同理的八株花生根瘤菌中有三株可感染大豆結瘤；在與凝集素鍵結反應中，有三株花生根瘤菌可與大豆凝集素反應，但是僅有一株菌株可感染大豆[29]。Law 及 Strijd的報告顯示大豆凝集素可與許多不同菌種的根瘤菌鍵結，而*B. Japonicum*也可與其他豆科

植物的凝集素反應，所以他們的結果也不支持此一假說[30]。Pull等人及Pueppke均分離出不產生凝集素之大豆品種，但是這些大豆均可被*B. japonicum*感染結瘤。由於這些結果及類似的結果被發現，使得"凝集素-多醣體的辨識假說"受到質疑而無法確立。

近年Diaz[33]的實驗中，*R. leguminosarum* biovar *viciae*感染豌豆為宿主，但不會感染白苜蓿，他們將豌豆凝集素的基因轉殖至白苜蓿，使白苜蓿能分泌豌豆凝集素，結果*R. leguminosarum* biovar *viciae* 可感染白苜蓿，但是此結果僅能証明豆科凝集素為感染機制中重要的因子，但仍缺乏直接的證據以支持該專一辨識的假說。

由於凝集素與根瘤菌的結合是可逆性的反應，同時也有許多相反的結果陸續被發表[34]。因此目前認為凝集素與根瘤菌表面多醣體的反應為增強菌體與根表面的親合性，並且可能參與感染絲形成的反應[35]。

類黃素(Flavonoid)與nod基因的表現

根瘤菌的遺傳基因被區分成許多不同的基因群，如 nod 基因群、nif 基因群、fix 基因群等。其中 nod 基因為結瘤作用所必須的基因，而 nod 基因又可區分為調節基因 nodD 基因，共通基因(common gene) nodABC 及宿主選擇基因nodEFGH。其他尚有許多基因的功能還未確定。結瘤基因之組成及功能列於表三中。

根瘤菌的結瘤基因表現受一些植物分泌物或萃取液的誘發，這些植物分泌物經分析為三環化合物類黃素。此化合物又可分為四大類，flavone、isoflavone、flavonol 及 flavanone，這些化合物為植物二次代謝產物，可誘發植物的結瘤基因。首先被確定的是紫苜蓿根分泌物中之luteoli，它可誘發*R. meliloti*的nodC基因的表現[36]。其他的植物白苜蓿分泌之DHF(7,4-dihydroxyflavone)誘導*R. trifolii*的nodABC基因的表現，而*B. japonicum*則受到genistein及daidzein的影響。這些基因受到類黃素化合物的影響，會產生一些訊號化合物，導致根毛數量增加，並使根毛彎曲[37]。 而nod基因中之nodD基因不會因為類黃素的存在與否而影響其活化之表現，同樣的若根瘤菌之突變株的nod基因中，nodD基因存在對其他之根瘤基因的活化有很大的影響。因此nodD基因為一調節基因，不僅可調控其他的nod基因的表現，尚可自我控制[38,39]。

nodD基因如何與類黃素化合物進行反應，以活化其它結瘤基因。經由許多學者提出一可能的模式為 nodD 基因指導合成一 NodD 蛋白，此一蛋白質與類黃素結合後與 "nod box" 結合，進而開啟活化其它的 nod 基因[40,41]。nodD基因的組成可能是一段基因，或兩組乃至三組基因，目前的研究發現*R. leguminosarum* biovar *viciae*及*R. leguminosarum* biovar *trifolii*的nodD基因為一段基因，*R. fredii*及*B. japonicum*為兩組(D1及D2)組成，*R. meliloti*則含有D1、D2及D3三組基因構成[42-45]。由於這些研究的發現，可以確定專一辨識的反應是一連續多重步驟的反應。

表三、結瘤基因及可能功能
TABLE 3. Nodulation genes and their possible functions

nod gene	approximate molecular mass (kD[a])[b]	Proposed function
A	22	Essential for root hair curling and cortical cell division; likely synthesizes a phytohormonelike substance
B	24	See nodA
C	47	See nodA
D	3S-39	Transcriptional. regulator
E	43	Host range; reported sequence similarity to thefabB gene of E. coli; encodes a condensing enzyme of fatty acid synthase; encodes a membraneprotein
F	10	Host range; reported sequence similarity to acyl carrier protein gene
G	17	Host range; reported sequence similarity to dehydrogenase genes
H	29	Host range; may encode a sulfate transferase for the synthesis of NodRm-1
I	34	Reported sequence similarity to ATP binding transport protein genes
J	28	Encodes a membrane protein; may act in conjunction with nodI
K	15	Reported only in *Bradyrhizobium* sp. (Parasponia); function unknown
L	20	Host range; reported sequence similarity to acetyltransferase gene
M	66	Host range; reported sequence similarity to amidotransferase gene
N	18	Host range; function unknown
O	30	Funetion unknown; encoded protein is exported; reported to bind calcium
P	35	Host range; likely encodes a subunit of ATP sulfurylase
Q	31	Host range; likely encodes a subunit of ATP sulfurylase
R	14	Reported only in *R. leguminosarum* bv. *viciae*; function unknown
S	23	Function unknown
T		Host range; function unknown
U	62	Function unknown
V	99	Reported only in *B. japonicum*; important for host range; sequence similarity to membrane sensor family genes
W	25	Reported only in *B. japonicurn*; important for host range; sequence similarity to transcriptional regulatory protein family genes
X		Reported only in *R. leguminosarum* strains capable of nodulating Afghanistan pea
Y	15	Reported only in *B. japonicum* but found in all rhizobia by hybridization;function unknown
Z	35	Host range; function unknown
nolA	27	Host range; essential for nodulation of selected soybean cultivars; reportedonly in *B. japonicum*; likely a transcriptional regulatory protein gene

[a] A variety Or other genes can afrect nodulation but have not been given the "nod" or "nol" designation. Thereader is referred to other recent reviews which describe these related genes.

[b] In most cascs, molecular masses are those deduced ram the DNA sequence. Molccular masses deduced by physical methods may deferrer.

在根瘤菌nod基因與感染機制的研究中發現，當 nod 基因開啓後，根瘤菌分泌出的訊號化合物將與專一辨識有關。在紫苜蓿與 *R. meliloti* 的反應中，*R. meliloti* 的 nodH 及 nodPQ 產生訊號化合物，會導至根毛彎曲，而且由分析發現至少含有三種具生物活性的化合物，這些化合物混合加入植物培養基中將導致根皮層細胞分裂，形成中空且不含細菌的似根瘤結構[46]。這些化合物中已確定者有二，分別是NodRm-1及NodRm-2。NodRm-1是含硫的N-acyl-tri-N-acetyl-β-1.4-D-glucosamine的四醣化合物，而NodRm-2與NodRm-1的差別在於NodRm-2不含硫酸鹽基團[35]。在 *B. japonicum* 之研究也發現一種類似 NodRm-1 的訊號化合物，具有非硫化的pentaglucosamine化合物[47]。另外在*R. leguminosarum*的nodD基因與豌豆根分泌物調控反應中也發現nodF基因控制類似acyl-carrier蛋白質，此與脂肪酸合成相關[48,49]。

因此，nod基因受到類黃素化合物的活化產生訊號化合物，可以抑制根的成長，導致根毛彎曲，誘發皮層細胞的分裂，根瘤的形成，以及類黃素的分泌量，加強 nod 基因的表現。這些反應都與宿主及根瘤菌間辨識反應相關。

結　論

根瘤菌與被感染的宿主間存有相當範圍的專一性，在這方面的研究也有20年以上的歷史，至今仍無法確定專一感染的步驟，雖有學者提出整個感染的過程是由多重的步驟所完成，但至今仍無一較完整的模式可以說明。本文將目前已完成之文獻加以整理，期望能提供學者了解固氮菌與宿主在專一感染時兩者間的反應，期盼能有更大之突破，使能清楚明瞭專一辨識之機制。

參考文獻

1. 宋樹群，林良平 1993 固氮根瘤菌之分類及演化。中華生質能源學會會誌 12：98-107。

2. Smith, D. C., and A. E. Douglas. 1987. Symbiosis between nitrogen-fixing prokaryotes and plant roots. In Smith, D. C.and A. E. Douglas. The Biology of Symbiosis. pp. 64-92. Edward Arnold, Ltd. London, U. K.

3. Elkan, G. H. 1992. Taxonomy of the rhizobia. Can. J. Microbiol. 38:446-450.

4. Elkan, G. H., and C. R. Bunn. 1991. The rhizobia. In Balows, A. H., G. Truper, M. Dworkin, W. Harder, and K. H. Schleifer (ed.) The Prokaryotes. 2nd ed. A Handbook on the Biology of Bacteria: Ecophysiology, Isolation, Identification, Applications. pp.2197-2213.

5. Alexander, M. 1977. Nitrogen fixation: symbiotic. In Alexander, M. Introduction to Soil Microbiology. pp. 305-330. John Wiley & Sons, Inc. New York.

6. Burton, J. C. 1979. *Rhizobium* species. In Peppler, H. J. ,and D. Perlman (ed.) Microbial Technology. Vol. 1. Microbial Processes. pp.29-58. Academic Press, New York .

7. Jordan, D. C., and O. N. Allen. 1974. Family III. Rhizobiaceae Conn 1938. In Buchanan, R. E., and N. E. Gibbons. (ed.) Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 8th ed. pp .261-264. Williams and Wikins, Baltimore, Md. U. S. A.

8. Jordan, D. C. 1982. Transfer of *Rhizobium japonicum* Buchanan 1980 to *Bradyrhizobium* Ben. nov., a genus of slow-growing, root nodule bacteria from leguminous plants. Int. J. Syst. Bacteriol. 32:136-139.

9. Jordan, D. C. 1984. Family III. Rhizobiaceae Conn 1938. In Krieg, N. R. and J. G. Holt. (ed.) Bergey's Mannual of Systematic Bacteriology. Vol. 1. pp. 234-254, Williams and Wikins, Baltimore, Md. U. S. A.

10. Jarvis B. D. W., C. E. Pankhurst, and J. J. Patel. 1982. *Rhizobium loti*, a new species of legume root nodule bacteria. Int. J. Syst. Bacteriol. 32:378-380.

11. Scholla, M. H., and G. H. Elkan. 1984. *Rhizobum fredii* sp. nov., a fast-growing species that effectively nodulates soybeans. Int. J. Syst. Bacteriol. 34:484-486.

12. Lindstrom, K. 1989. *Rhizobium galegae*, a new species of legume root nodule bacteria. Int. J. Syst. Bacteriol. 39:365-367.

13. Chen, W. X., G. S. Li, Y. T. Wang, H. L. Yuan and J. L. Li. 1991. *Rhizobium huakuii* sp. nov. isolated from the root nodules of *Astragalus sinicus*. Int. J. Syst. Bacteriol. 41:275-280.

14. Martinez-Romero, E., L. Segovia, F. M. Mercante, A. A. Franco, P. Graham, and M. A. Pardo. 1991. *Rhizobium tropici*, a novel species nodulating *Phaseolus vulgar* is L. beans and *Leucaena* sp. trees. Int. J. Syst. Bacteriol. 41:417-426.

15. Dreyfus, B. J. L. Garcia, and M. Gillis. 1988. Characterization of *Azorhizobium caulinodans* Ben. nov., sp. nov., a stem - nodulating nitrogen-fixing bacterium isolated from *Sesbania rostrata*. Int. J. Syst. Bacteriol. 38:89-98.

16. Broughton, W. J. 1978. Control of specificity in legume-*Rhizobium* associations. J. Appl. Bacteriol. 45:165-194.

17. Goldstein, I. J., and R. D. Poretz. 1986. Isolation, physicochemical, characterization, and carbohydrate-binding specificity of lectins. In Liener, I. E., N. Sharon, I. J. Goldstein . (ed.) The Lectins. Properties, Functions, and Applications in Biology and Medicine. Academic Press, Inc, Orlando, Florida, U.S.A.

18. Doyle, R. J., and M. Slifkin. 1989. Applications of lectins in microbiology. ASM news . 55:655-658

19. Hamblin, J., and S. P. Kent. 1973. Possible role of phyto-haemagglutininin Phaseolus *vulgar* is L. Nature New Biol. 245:28-30.

20. Bohlool, B. B., and E. L. Schmidt. 1974. lectins: a possible basis for specificity in the *Rhizobium*-legume root nodule symbiosis. Science 185:269-271

21. Dazzo, F. B., and D. H. Hubbell. 1975. Cross reactive antigens and lectins as determinants of symbiotic specificity in the *Rhizobium*-clover association. Appl. Microbiol. 30:1017-1033.

22. Dazzo. F. B., C. A. Napoli, and D. H. Hubbell. 1976. Adsorption of bacteria to roots as relet Ed to host specificity in the *Rhizobium*-clover symbiosis. Appl. Environ. Microbiol. 32:166-171.

23. Dazzo. F. B., and W. J. Brill. 1977. Receptor site on clover and alfalfa roots for *Rhizobium*. Appl. Environ. Microbiol. 33:132-136.

24. Paau, A. S., W. T. Laps, and W. J. Brill. 1981. Agglutinin from alfalfa necessary for binding and nodulation by *Rhizobium melileti*. Science 213:1513-1515.

25. Calvert, H. E., M. Lalonde, T. V. Bhuvanswari, and W. D. saver. 1978. Role of lections in plant-microorganism interactions. IV. Ultrastructurel location of soybean lectin binding sites of *Rhizobium japonicum*. Can. J. Microbiol. 24:785-793.

26. Tsien, H . C ., and E . L . Schmidt . 1981. Localization and partial characterization of soybean lectin-binding polysaccharide of *Rhizobium japonicum*. J. bacteriol. 145:1063 - 1074.

27. Kato, G., Y. Maruyamn, and M. Nakamura. 1980. Role of bacterial lipopolysaccharides in the adsorption process of the *Rhizobium*-pea symbiosis. Agric. Biol. Chem. 46:2843-2855.

28. Wolpert, J. S., and. P. Albersheim. 1976. Host-symbiont interaction. I. The lectins of legume interact with the O-antigen-containing lipopolysaccharides of their symbiont rhizobia. Biochem. Biophys. Res. Commun. 90:729-757.

29. Pueppke, S. G., T. G. Freund, B. C. Schulz,and H. P. Friend man. 1980. Interaction of lectins from soybean and peanut with-rhizobia that nodulate soybean, peanut, or both plants. Can. J. Microbiol. 26:1489-1497.

30. Law, I. J., and B. W. Strijdom. 1977. Some observations on plant lectins and *Rhizobium* specificity . Soil Biol . Biochem. 9:79-84.

31. Pull, S. P., and. S. G. Pueppke, T. Hymowitz, and J. H. Orf. 1978. Soybean lines lacking the 120,000-dalton seed lectin. Science. 200:1277-1279.

32. Pueppke, S. G. 1983. *Rhizobium* infection threads in root hairsof *Glycine Max* (L.) Merr., *Glycine soja* Sieb. & Zucc., and *Vigna unguiculata* (L.) Walp. Can. J. Microbiol. 29:69-76.

33. Diaz. C. L., L. S. Melchers, P. J. J. Hooykaas, B. J. J. Lugtenberg and J. W. Kline. 1989. Root lectin as a determinant of host-plant specificity in the *Rhizobium*-legume symbiosis. Nature 338:579-581.

34. Sharon, N., and H. Lis. 1989. Lectins as cell recognition molecules. Science. 246:227-243.

35. Roth, L. E. and G. Stacey. 1991. *Rhizobium*-legume symbiosis. In Dworkin, M. (ed.) Microbial Cell-Cell Interactions. pp.255-301. American Society for Microbiology. Washington, D. C., U. S. A.

36. Peters, N. K., J. W. Frost, and S. R. Long. 1986. A plant flavone, luteolin, induces expression of *Rhizobium meliloti* nodulation genes. Science 233:977-980.

37. Zaat, S. A. J., A. A. N. van Brusel, T. Tak, E. Pees, and B. J. J. Lugtenberg. 1987. Flavonoid induce *Rhizobium leguminosarum* to produce nodDABC gene - related factors that cause thick, short roots and root hair responses on common vetch. J. Bacteriol. 169:3388-3391.

38. Long, S. R. 1989. *Rhizobium* genetics. Ann. Rev. Genet. 23:483-506.

39. Rossen, L., C. A. Shear man, A. W. B. Johnston, and J. A. Downie. 1985. The nodD gene of *Rhizobium leguminosarum* is autoregulatory and in the presence of plant exudate induces the nod A ,B, C genes. EMBO J. 4:3369-3373.

40. Wang, S. P. and G. Stacey. 1990. A divergent nod box sequence is essential for nodD1 induction in *B. japonicum*. PP. 600. In gresshhoff, P. M., L. E. Roth, G. Stacey, and W. E. Newon (ed.) Nitrogen fixation:Achievements and objectives. Chapmen and Hall, New York, U.S.A.

41. Hong, G. F., J. E. Barn, and A. W. B. Johnston. 1987. Evidence the DNA involved in the expression of nodulation (nod) genes in *Rhizobium* binds to the product of the requlatory gene nodD. Nucleic Acid Res. 15:9677-9689.

42. Wijffelman, C., H. Spaink, H. Schlman, B. Zaat, K. Recourt, R. De Maagd, R. Okker, and B. J. J. Lugtenberg. 1989. Regulation of nod gene expression: the role of nodD protein. pp.137-144. In B. J. J. Lugtenberg. (ed.) Signal molecules in plants and plant-microbe interaction. Springer-Verlag, Berlin. Germany.

43. Applbaum, E. R., D. V. Jhompson, K. Idler, and N. Chartrain. 1988. *Rhizobium japonicum* USDA 191 has two nodD genes that differ in primery structure and functtion. J. Bacteriol. !70:12-20.

44. Gottfert, M., J. W. lamb, R. Gasser, J. Semanza, and H. Henneck. 1989. Mutational analysis of the *Bradyrhizobium japonicum* common nod genes and further nod box-linker genomic DNA region. Mol. Gen. Genet. 215:407-415.

45. Honma, M. A., and F. M. Ansuble. 1987. *Rhizobium meliloti* has three functional copies of the nodD symbiotic requlatory gene. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 84:8558-8562.

46. Faucher, C., S. Camut, J. Denarie, and G. truchet. 1989. The nodH and nodQ host rang genes of *Rhizobium meliloti* behave as avirulence genes in *R. leguminosarum* bv. *viciae* and determine changes in the production of plant-specific extracellular signals. Mol. Plant microbe Interact. 2:291-300.

47. Verma, D. P. S. 1992. Signals in root nodule organogenesis and endocytosis of *Rhizobium*. Plant Cell 4:373-382.

48. Lipman, F. l971. Attempts to map a process evolution of peptide biosythesis. Science 173:875-884.

49. Shearman, C. A., L. Rossen , A. W. B. Johnston, and J. A. Downie. 1986. The *Rhizobium leguminosarum* nodulation gene nodF encodes a polypeptide similar to acyl-carrier protein and is regulated by nodD plus a factor in pea root exudate. EMBO J. 5:647-652

討　論

溪口鄉陳銘森農友問:

根瘤菌對大氣中氮固氮機制?

長庚醫學院宋樹群答:

根瘤菌感染至豆科宿主形成根瘤後,在類菌體的外圍,形成一菌體外膜,可阻擋O_2的進出,在此時由與氧氣具高親合性的豆血紅素攜帶進入,使類菌體內之好氧酵素產生足量之ATP,提供固氮酵素利用,完成固氮反應。

The Relationship between Rhizobia and Legume Host

Shuh-Chyung Song(1) and Liang-Ping Lin(2)

(1) Institute of Molecular and Cellular Biology, Chang-Gung Medical College
(2) Deparment of Agricultural Chemistry, National Taiwan University

ABSTRACT

Rhizobia can infect legume plants and form nodules in which rhizobia fix nitrogen gas. This reaction has been established over 100 years ago, in 1888. Although the infectious process has been interpreted, its detailed steps are not well established. The relationship between rhizobia and its host has been obtained we established the specificity of infectious relationship, and gave *Rhizobium* a species name. Until 1974, there were six species of *Rhizobium*, which subsequently were modified to three genera. Based on the mechanism of specific infection, some researchers suggested a "lectin-polysaccharide recognition hypothesis"for interpreting the phenomenon of infection. They postulated that leguminous lectins can recognize and bind bacterial extra cellular polysaccharides forming a bridge connecting rhizobia and host. The specificity of the infectious process is carried out through this bridge reaction. However, many contrary data were published, so that this hypothesis cannot be sustained for explaining the host-parasite relation. Recently, some investigations revealed that flavonoid compound, which are secreted from plant roots, can induce the nod genes of rhizobia. Thereafter, rhizobia releases oligosaccharides as signal compounds into the rhizophere, which in turn would decide the relationship between host and symbiont. Thus, we require more precise techniques and better results, ie. immunochemistry, genetic engineering, etc. to establish the infectious relationship between rhizobia and legume host.

Key words: *Rhizobium*, legume, lectin, polysaccharide, flavonoid,nod gene